



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C07K 14/47, C12N 15/12, C12Q 1/68, C12N 5/00, C07K 16/18, G01N 33/53, A01K 67/027</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/44783</p> <p>(43) 国際公開日 2000年8月3日(03.08.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00413</p> <p>(22) 国際出願日 2000年1月27日(27.01.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/21543 1999年1月29日(29.01.99) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 宮田敏男(MIYATA, Toshio)[JP/JP] 〒259-1117 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101 Kanagawa, (JP)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 黒川 清(KUROKAWA, Kiyoshi)[JP/JP] 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町49 市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MEG-4 PROTEIN</p> <p>(54)発明の名称 メグー4タンパク質</p> <p>(57) Abstract A DNA expressed in mesangial cells at a high frequency and a protein (MEG-4) encoded by this DNA. These substances are useful in fixing mesangial cells, detecting abnormality in mesangial cells, etc. Moreover, it is expected that the function of mesangial cell can be disclosed based on the function of this protein and, in its turn, causes of mesangial cell-related diseases can be clarified. It is also expected that these substances are applicable to the treatment, diagnosis, etc. of mesangial cell-related diseases.</p>		

(57)要約

本発明は、メサンギウム細胞で高頻度に発現しているDNA、そしてこのDNAがコードするタンパク質（メグー4）を提供する。これらは、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルギナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ヴェトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明細書

### メグー 4 タンパク質

#### 技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、特に腎細胞の遺伝子の単離に関する。

#### 背景技術

体内の 60 兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノム DNA を有している。正常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

メサンギウム細胞(mesangial cell)は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。そしてメサンギウム細胞は、各種腎炎においても中心的な病態生理学的意義を有する。例えばメサンギウム細胞の増殖、および細胞外の糸球体間質マトリックスの蓄積は、慢性腎炎および糖尿病性腎症のような様々な糸球体疾患の患者の糸球体硬化症の重要な病理所見である。従って、メサンギウム細胞で発現している遺伝子を見だしその機能を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効である。

メサンギウム細胞のマーカーとしては、ラットでは Thy1 抗原が知られている。しかしこの遺伝子はメサンギウム細胞特異的ではないうえ、ヒトではメサンギウム細胞には発現していない (Miyata T. et al., Immunology(1989); 67: 531-533; Miyata T. et al., Immunology(1990); 69: 391-395)。また、メサンギウム細胞は活性化されると  $\alpha$  平滑筋アクチンを発現することが知られているが、この遺伝

子もメサングウム細胞特異的ではない。このように、メサングウム細胞に特徴的な遺伝子については、従来報告がなかった。

なお本発明者は、先にメサングウム細胞に特異的に発現しているタンパク質としてメグシンを報告している (J.Clin. Invest, 1998 Aug 15, 102:4, 828-36)。本発明は、このメグシンとも明確に異なった構造を持つ新規なタンパク質に関する。

### 発明の開示

本発明は、メサングウム細胞で高度に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

本発明者は、ヒトメサングウム細胞のインビトロ培養物から mRNA を単離し、3'側の cDNA ライブラリーを作成した。そして、該 cDNA ライブラリーの中からランダムに多数のクローンの配列を決定し、該塩基配列を、種々の臓器及び細胞から得られた既知の 3'側の cDNA クローンの塩基配列と比較することによって、メサングウム細胞で発現しているクローンを選択した。そのうち、メサングウム細胞において特に出現頻度の高いクローンの一つを選択した。更にこのクローンのインサートをプローブとしてメサングウム細胞から調製した  $\lambda$ ZIPLox cDNA ライブラリーをスクリーニングし、ポジティブクローンの塩基配列を決定した。決定された cDNA の塩基配列に基づいて、最も長いオープンリーディングフレームのアミノ酸配列を明らかにした。このアミノ酸配列には、いくつかの特徴的なモチーフを見出すことができた。また既知のタンパク質であるマウス ATP 依存性メタロプロテアーゼ (ATP dependent metalloprotease; ATP-MP) とのホモロジーが確認されたことから、このアミノ酸配列を本発明による cDNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列であると推定した。このアミノ酸配列を持つ本発明によるタンパク質を、本発明者はメグー 4 (Meg-4) と命名した。ヒト・メグー 4 の cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、ヒト・メグー 4 の推定アミノ酸配列を配列番号：2 に示した。

このアミノ酸配列について、SwissProt データベースのアミノ酸配列とホモロジー検索を行い、メグー 4 が新規なタンパク質であり、AAA タンパク質ファミリー(ATPases associated with different cellular activities protein family)に特徴的な AAA モチーフ (Walker, J.E. et al. EMBO J. 8, 945-951, 1982, Swaffield, J.C. et al. Nature, 374, 88-91, 374, Fry, D.C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 907-911, 1997, Frohlich, K.U. et al. J. Cell. Biol. 114, 443-453, 1991) を含んでいることを確認した。更にノーザンブロッティングによりメグー 4 の組織分布をみたところ、メグー 4 は、ヒトの肺や肝臓ではほとんど発現が見られず、腎臓をはじめとして、心臓、脳、胎盤、骨格筋、あるいは膵臓等の組織で発現が観察された。細胞レベルで見ると、メサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。その他に、繊維芽細胞や上皮細胞などでの発現も観察された。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

即ち、本発明は具体的には以下のものを含む。

- 〔1〕 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。
- 〔2〕 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列に対して、90%以上のホモロジーを持つアミノ酸配列からなる〔1〕に記載のタンパク質。
- 〔3〕 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列を含む〔1〕に記載のタンパク質。
- 〔4〕 〔1〕に記載のタンパク質をコードするDNA。
- 〔5〕 配列番号：1 に記載の塩基配列に対して、85%以上のホモロジーを持つ塩基配列からなる〔4〕に記載のDNA。
- 〔6〕 配列番号：1 に記載の塩基配列におけるタンパク質コード領域を含む〔5〕に記載のDNA。

- 〔 7 〕 配列番号： 1 に記載の塩基配列を持つ DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、〔 1 〕 に記載のタンパク質をコードする DNA。
- 〔 8 〕 配列番号： 1 に記載の塩基配列からなる DNA、またはその相補鎖と特異的にハイブリダイズする DNA であって、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を持つ DNA。
- 〔 9 〕 〔 6 〕 に記載の DNA もしくはその一部に対するアンチセンス DNA。
- 〔 10 〕 〔 4 〕、〔 5 〕、〔 6 〕、および〔 7 〕のいずれかに記載の DNA を含むことを特徴とするベクター。
- 〔 11 〕 〔 4 〕、〔 5 〕、〔 6 〕、および〔 7 〕のいずれかに記載の DNA を発現可能に保持する形質転換細胞。
- 〔 12 〕 〔 11 〕 に記載の形質転換細胞を培養し、〔 4 〕、〔 5 〕、〔 6 〕、および〔 7 〕のいずれかに記載の DNA の発現産物を回収することを特徴とする、〔 1 〕 に記載のタンパク質の製造方法。
- 〔 13 〕 〔 1 〕 に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。
- 〔 14 〕 配列番号： 2 のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質を認識する〔 13 〕に記載の抗体。
- 〔 15 〕 抗体がモノクローナル抗体である〔 14 〕に記載の抗体。
- 〔 16 〕 〔 14 〕または〔 15 〕に記載の抗体と〔 2 〕に記載のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて〔 3 〕に記載のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。
- 〔 17 〕 〔 14 〕または〔 15 〕に記載の抗体を含む〔 3 〕に記載のタンパク質またはその断片の免疫学的測定用試薬。
- 〔 18 〕 生体試料中に含まれる〔 3 〕に記載のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎症を検出する方法。
- 〔 19 〕 メグー 4 をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランス

ジェニック非ヒト脊椎動物。

〔20〕 非ヒト脊椎動物がマウスである〔19〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔21〕 メグー 4 をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである〔20〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

前記課題を達成するために本発明者は、3' 領域 cDNA ライブラリー(3'-directed cDNA library)を用いた。この方法により、クローニング効率に及ぼす cDNA の大きさの影響を回避することができる。3' 領域の配列は各遺伝子に特有なものであり、約 200~300bp の配列データは、その遺伝子の特徴を明らかにするのに充分である。

本発明のヒト・メグー 4 をコードする DNA は、メサングウム細胞から mRNA を調製した後、既知の方法により二本鎖 cDNA に変換することにより得ることができる。mRNA の調製はグアニジンイソチシアネート-塩化セシウム法 [Chirwin, et al. Biochemistry 18, 5294 (1979)]、デオキシリボヌクレアーゼ存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行なう方法 [Berger & Birkenmeier, Biochemistry 18, 5143 (1979)] などを用いることができる。poly(A)<sup>+</sup>RNA は、オリゴ(dT)を結合した担体（例えばセファロース、セルロースやラテックス粒子等）を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどを用いて total RNA から調製することができる。得られた mRNA を鋳型として、3' 端にある poly(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマー、あるいはメグー 4 のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理すれば、mRNA とその相補的 DNA (cDNA) からなるハイブリッド鎖が得られる。その mRNA 鎖を、例えば E. coli RNase H、E. coli DNA polymerase I、E. coli DNA Ligase で処理し、DNA 鎖に置換することにより、二本鎖 cDNA を得ることができる。

ヒト・メグー 4 遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、メサン

ギウム細胞 poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳形にして RT-PCR 法によりクローニングすることも可能である。また、PCR によらず、ヒト・メグー 4 遺伝子塩基配列をもとにプローブを合成し、直接 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、目的とする cDNA を得ることもできる。本発明の遺伝子は、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより、選択することができる。

その他、たとえば実施例 8 において示すように、ヒト・メサングウム細胞の cDNA ライブラリーを鋳型として、配列番号：7 に示したようなメグー 4 フェノタイプを単離することができる。このようなフェノタイプは、本発明のメグー 4 に含まれる。あるいはマウスやラット等、ヒト以外の種におけるメグー 4 のホモログについても、同様の手法により cDNA の取得が可能である。

更に、メグー 4 のホモログの cDNA を以下のような手法によって単離することも可能である。すなわち、前記ヒト・メグー 4 cDNA の塩基配列をプローブとして用い、cDNA ライブラリーをコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングして、メグー 4 のホモログをコードする cDNA を単離することができる。cDNA ライブラリーは、マウス、ラットの組織や、培養メサングウム細胞等から抽出した mRNA を鋳型として合成することができる。あるいは、市販 cDNA ライブラリー（フナコシ製等）を用いることもできる。この他に、本発明によるヒト・メグー 4 の cDNA をもとに、ORF の前後にディジェネレーティブプライマーを設計し、これを利用した PCR によってホモログの cDNA を増幅する方法を用いることもできる。

AAA タンパク質ファミリーは、AAA モチーフを共有するものの、その他の領域においては必ずしも類似の配列を示すとは限らない。しかしながら、たとえば後に述べるマウス ATP-MP のようなホモログにおいては、AAA モチーフ以外の領域においてもある程度の類似性があり、PCR による増幅が可能である。マウスのほか、ラットにおいてもディジェネレーティブプライマーによってメグー 4 ホモログの cDNA 断片の増幅が可能であることを、本発明者は確認している。



ヒト・メグー 4 ゲノムは、ゲノミックライブラリーのスクリーニングによって得ることができる。ゲノミックライブラリーは、たとえばヒト B リンパ芽球からゲノムを調製し、Sau3 で部分的に切断した DNA をファージベクターである EMBL3 に組み込むことにより合成することができる (Blood, vol 83, No 11, 1994: pp 3126-3131)。このようなゲノミックライブラリーについて、プラークハイブリダイゼーション法 (新細胞工学実験プロトコル、秀潤社、pp79-92、参照) を行えば、目的とするゲノムを含むクローンを取得できる。プローブとしては、メグー 4 cDNA のオープンリーディングフレーム全ての領域 (2322bp)、または cDNA 部分をプライマーとしてヒトゲノム DNA を PCR 法を用いて増幅することにより得られた各エクソン・イントロン部分を用いることができる。後に述べるように、メグー 4 遺伝子は 10 番染色体の短腕 10p11.23-12.1 にマッピングされていることから、この領域を含むゲノミッククローンからヒト・メグー 4 ゲノムを容易に単離することができる。

また、同時に調節領域に関しても、ヒト培養メサングウム細胞由来 mRNA、もしくはヒト腎臓 mRNA (Clontech 社より購入) を鋳型として、5' RACE 法 (5'-Full RACE Core Set (宝酒造 (株) の方法に従う)) を用いて 5' UTR の配列決定を行うことができる。

本発明の遺伝子は、例えばホスホアミダイド法 [Mattencchi, M.D. & Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)]、ホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al. Nature 310, 105 (1984)] 等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

なお、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多く、この多形現象によって 1 個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあるが、通常タンパク質の活性は維持される。また、一般に、1 個または数個のアミノ酸配列の改変によって、タンパク質の活性が維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2 に示され

るアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り、すべて本発明に含まれる。また、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り、すべて本発明に含まれる。

その他、本発明のタンパク質には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、本発明によるメグー4と機能的に同等なタンパク質が含まれる。なお本発明において機能的に同等とは、メグー4と同等の生物学的特性を持つことを意味する。本発明者は、メグー4にたとえば以下のような生物学的な特性を見出している。

まず、メグー4はその構造上AAAタンパク質ファミリーに属する。ここで、AAAタンパク質ファミリーとは、 $Mg^{2+}$ 依存性のATPase活性を持ち、高度に保存された230-250塩基からなるAAAモチーフ(ATP結合モチーフ、最小AAAタンパク質モチーフ、およびwalker Bモチーフを含む)、並びに金属結合モチーフ(HEXXH)を持ったタンパク質である。いくつかのATP-MPが、AAAタンパク質として知られている。しかし、それらの細胞局在はまちまちである。また機能的にも、セルサイクルの制御、タンパク質の分解、オルガネラ生合成、あるいはタンパク質輸送など幅広い機能が報告されている。

またメグー4の発現特性として、腎メサングウム細胞で高度に発現している他、腎、心、脳、胎盤、骨格筋、あるいは脾等の組織で発現が観察され、肺と肝においては発現が弱い。更に培養癌細胞株においては、メグー4の顕著な発現は観察されない。各組織におけるメグー4の発現状態は、たとえば配列番号：1から選択された塩基配列を持つプローブによって、各組織から調製したmRNAを試料としてノーザンブロットアッセイを行うことによって知ることができる。

以上のような生物学的特性について、機能的に同等なタンパク質は、いずれも

本発明によるメグー 4 を構成する。したがって、具体的に構造を明らかにしたヒトのメグー 4 のみならず、構造的にあるいは機能的に同等な他の種のホモログは本発明に含まれる。

本発明において、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列に対して 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列とは、好ましくは配列番号：2 で表されるアミノ酸配列に対して全体として 90 % 以上のホモロジーを持つ配列を挙げることができる。アミノ酸配列のホモロジーは、FASTA によって求められる。より具体的には、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 - 50 個、好ましくは 1 - 10 個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換された配列、欠失した配列、付加された配列、あるいは挿入された配列を示すことができる。

また、本発明の DNA には、これらの機能的に同等なタンパク質をコードする DNA が含まれる。これらのタンパク質をコードする DNA は、cDNA のみならずゲノム DNA や合成 DNA であることもできる。

また、所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる [Grantham, R. et al. Nucleic Acids Res. 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、DNA を適宜改変したものもまた本発明の DNA に含まれる。所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5662 (1984)] 等にしたがって、これら核酸配列のコドンの一部改変することができる。

更に、配列番号：1 に記載の塩基配列を含む DNA とハイブリダイズすることができ、かつその DNA によってコードされるタンパク質が本発明によるメグー 4 に特徴的な機能を有する限り、その DNA は本発明による DNA に含まれる。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配

列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジェントな条件とは、一般的には以下のような条件を示すことができる。すなわち、 $4 \times \text{SSC}$ 、 $65^\circ\text{C}$ でハイブリダイゼーションさせ、 $0.1 \times \text{SSC}$ を用いて $65^\circ\text{C}$ で1時間洗浄する。ストリンジェンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度( $T_m$ )に応じて調整することができる。 $T_m$ はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成（塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度）によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジェンシーを与える条件を経験的に設定することができる。あるいは本発明のDNAには、配列番号：1に示す塩基配列に対して、FASTAやBLASTによるホモロジー検索によって好ましくは85%以上、より好ましくは95%以上のホモロジーを持つ塩基配列からなるDNAが含まれる。

変異体も含め本発明によるDNAの塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。

このようにしてクローン化されたメグー4をコードする遺伝子は適当な発現ベクターDNAに組み込むことにより、他の原核細胞または真核細胞の宿主を形質転換させることができる。さらに、これらの発現ベクターに適当なプロモーターおよび形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。発現ベクターとしては、例えば大腸菌の場合は、pET-3 [Studier & Moffatt, J. Mol. Biol. 189, 113(1986)] 等が、COS細胞の場合はpEF-BOS [Nucleic Acids Research 18,5322 (1990)]、pSV2-gpt [Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 78, 2072 (1981)] 等が、CHO細胞の場合はpVY1 [国際公開第89/03874号公報] 等がそれぞれ挙げられる。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して融合タンパク質として発現させることにより、精製を容易にし、その後目的タンパク質を切り出すことも可能である。融合させるタンパク質としては、ヒスチジンタグ、c-

myc タグ、MBP-タグ、あるいは GST-タグ等が知られている。これらのタグを融合させた状態でインサートを発現させることができるベクターは市販されている。

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。また真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばサッカロミセス・セレビシェー (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられ、哺乳動物由来の宿主細胞としては、例えば COS 細胞、CHO 細胞、BHK 細胞等が挙げられる。なお、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行なえばよい。

以上のようにして目的とするメグー 4 をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生されたメグー 4 は、細胞内または細胞外から分離し均一なタンパク質にまで精製することができる。なお、本発明の目的タンパク質であるメグー 4 の分離、精製は、通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー等を適宜選択し、組み合わせれば、メグー 4 を分離、精製することができる。

なお、上述の他、本発明の遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターによる形質転換体および該遺伝子を用いたメグー 4 の製造過程における遺伝子操作の処理手段は、「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) に記載の常法に従って行うことができる。

この他、配列番号：1 に記載の塩基配列に基づいて、メグー 4 遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含む DNA や RNA を増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとに、プローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っていることである。設定された塩基配列を持つオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは、PCR のような核酸の合成反応に利用することができる。プロー

ブやプライマーに利用するオリゴヌクレオチドは、少なくとも 15 塩基、好適には 25-50 塩基の長さとするのが望ましい。

更に本発明が明らかにしたメグー 4 をコードする遺伝子の塩基配列に基づいて、メグー 4 の発現を制御しうるアンチセンス核酸が提供される。本発明によるアンチセンス核酸は、メグー 4 のメサンギウム細胞における役割を明らかにするための重要なツールとなる。あるいはメグー 4 の発現亢進によってもたらされる病態の制御に有用である。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつくられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNA の翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるタンパク質鎖に伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制、などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座 2 核酸 I V 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp. 319-347, 1993)。

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子の mRNA の 5' 端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは 3' 側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し

得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む DNA も、本発明で利用されるアンチセンス DNA に含まれる。使用されるアンチセンス DNA は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは 3' 側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された DNA は、公知の方法で、所望の宿主へ形質転換できる。アンチセンス DNA の配列は、形質転換する宿主が持つ内在性遺伝子（あるいはその相同遺伝子）、またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。

アンチセンス DNA を鋳型として転写された RNA が、標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは 90%、最も好ましくは 95% の相補性を有するように設計する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンス DNA の長さは、少なくとも 15 塩基以上であり、好ましくは 100 塩基以上であり、さらに好ましくは 500 塩基以上である。通常、用いられるアンチセンス RNA の長さは 2.5kb よりも短い。

更に本発明が提供するメグー 4 の cDNA 塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するメグー 4 遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することができる。in situ ハイブリダイゼーションの結果、メグー 4 遺伝子は 10 番染色体の短腕 10p11.23-12.1. (図 4) の領域にマッピングされた。したがって、メグー 4 遺伝子のプロモーター領域やエンハンサー領域は、この領域の上流を含むゲノミッククローンから公知の方法に基づいて得ることができる。

具体的には、特開平 6-181767 号公報、「The Journal of Immunology (1995) 155, 2477-2486, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995), 92, 3561-3565」等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。なお、本明細書において、プロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御する DNA 領域を、エンハンサー領域とはイントロンまたは 3' UTR に存在する遺伝子の発現を制御する DNA 領域をいう。

具体的には、プロモーター領域は、例えば、以下の方法によって取得することができる。

- 1) メグー 4 の cDNA の 5' 末端側をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりメグー 4 のプロモーター領域をクローニングする。
- 2) 制限酵素消化してメグー 4 遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流部分 (2 ~ 5 kbp) のプロモーター領域を含む DNA を得、塩基配列を決定する。ヒトメサングウム細胞から調製した poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型とし、メグー 4 遺伝子の 5' 末端側 cDNA 配列より選択したプライマーDNA を用いたプライマー伸長法により、転写開始点 (+1) を決定する。塩基配列から転写因子結合配列を検索し、プロモーター活性を有する可能性がある箇所を予想する。
- 3) 2) で得た DNA からメグー 4 遺伝子のコード領域を除いた DNA 断片をプラスミド上にサブクローニングし、この DNA 断片の 2 ~ 5 kbp 下流に、レポーター遺伝子としてのクロラムフェニコールアセチル転位酵素 (CAT) 遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。同様に、プロモーター領域の可能性のある各箇所を含むような形で、制限酵素消化により、或いは、PCR により、5' 末端側及び 3' 末端側を順次削ったメグー 4 遺伝子上流部分の様々な部位に該当する DNA 断片を作成し、これらの下流に、レポーター遺伝子としての CAT 遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。
- 4) 3) で作製したレポータープラスミドで形質転換した動物細胞の CAT 或いはルシフェラーゼ活性を測定することにより、メグー 4 遺伝子上流部分に存在するプロモーター領域を得る。

また、3' UTR、イントロン中のエンハンサー領域は、メグー 4 cDNA をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりヒト・メグー 4 のゲノム遺伝子をクローニングし、上述のプロモーターに関する方法と同様にして、エンハンサー活性を有する領域を得ることができる。



メグー 4 遺伝子の発現を制御している転写因子は、「新細胞工学実験プロトコール（秀潤社）」、「バイオマニュアルシリーズ 5 転写因子研究法（羊土社）」、「DNA & Cell Biology, 13, 731-742 (1994)」に記載の方法等の公知の方法、例えば、アフィニティーカラムを用いた方法、サウスウエスタン法、フットプリンティング法、ゲルシフト法、または one-hybrid 法で得ることができる。なお、本明細書において、転写因子とはメグー 4 遺伝子の転写を調節している因子で、転写の開始反応を誘導する転写開始因子と、転写を正または負に調節する転写調節因子をさす。

アフィニティーカラム法を用いる場合は、前述の方法で得た、プロモーター領域、エンハンサー領域をセファロース或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、核抽出液をかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化した配列と同様の配列を有する DNA を用い、結合した転写因子を溶出することによって、メグー 4 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

また、サウスウエスタン法を用いる場合は、大腸菌の発現ベクター、例えば  $\lambda$ gt11 に cDNA を挿入し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質を合成させ、ニトロセルロース膜に該融合タンパク質を吸着させて、放射性同位元素で標識されたプロモーター領域、エンハンサー領域の DNA 断片をプローブにし、結合活性をもつ融合タンパク質を合成するファージを選択することによって、メグー 4 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

ゲルシフト法は、遊離の DNA がタンパク質と結合したときにポリアクリルアミドゲルによる電気泳動の移動度に差を生じる現象に基づいている。プロモーター領域やエンハンサー領域の DNA 断片をプローブとし、転写因子が含まれる試料（たとえば核タンパク質抽出液）と混合して、低イオン強度の元で電気泳動分析する。転写因子の結合は、遊離の DNA とは違った移動度のバンドとして検出される。ゲルシフト法は、タンパク質の混合物から高い感度で転写因子を分離することができる。

ゲルシフト法によって得られた DNA と転写因子の複合体を、更にフットプリント法によって解析すると、転写因子の結合部位を決定することができる。フットプリント法は、DNA 上にタンパク質が結合すると DNase I の消化から保護される現象を利用している。すなわち、末端を  $^{32}\text{P}$  で標識したプロモーター領域やエンハンサー領域の DNA を、転写因子の共存化で DNase I によって部分消化し、これを塩基配列決定用の変性ポリアクリルアミドゲルで分離する。転写因子の無い状態で同様の処理を行った結果と比較すると、転写因子の結合によってバンドの消失が観察されることから、その結合部位の推定が可能となる。

本発明はまた、メグー 4 を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には、例えば、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。メグー 4 または本発明のメグー 4 の部分ペプチドに対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のメグー 4、本発明のメグー 4 の部分ペプチド、あるいは本発明による c-myc-(His)<sub>6</sub>-Tag-メグー 4 や MBP-メグー 4 のような融合タンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。より具体的には、他の AAA ファミリーとの相同性が低く、かつ親水性を有する領域のアミノ酸配列を含むペプチドは、免疫原として有用である。実施例で確認しているとおり、配列番号：2 に示すアミノ酸配列において、574-593 位に相当するアミノ酸配列 KDKILMG PERRSVEIDNKNK（配列番号：9）を免疫原として用いることにより、メグー 4 特異的な抗体が得られている。その他、本発明のモノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

本発明のメグー 4、または本発明のメグー 4 の部分ペプチドは、温血動物に対して投与による抗体産生が可能な部位に、公知の担体や希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 1~6 週毎に 1 回ずつ、計 2~10 回程度行われる。抗体産生に用いられる温血動物としては、例えばサル、ウ

サギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、あるいはニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびウサギが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化メグー4と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495 (1975)) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが挙げられるが、X-63Ag8が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗メグー4抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えばメグー4抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体）が用いられる。またはプロテインAを加え、固相に結合した抗メグー4モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したメグー4を加え、固相に結合した抗メグー4モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

抗メグー4モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知または

それに準じる方法に従って行うことができる。通常 HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1～20%、好ましくは 10～20%の牛胎児血清を含む RPMI1640 培地（大日本製薬（株））、1～10%の牛胎児血清を含む GIT 培地（和光純薬工業（株））、またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常 20～40℃、好ましくは約 37℃である。培養時間は、通常 5 日～3 週間、好ましくは 1 週間～2 週間である。培養は、通常 5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗メグー 4 抗体価の測定と同様にして測定できる。クローニングは、通常半固体アッガー法や限界希釈法などのそれ自体公知の方法で行うことができ、クローン化されたハイブリドーマは、好ましくは無血清培地中で培養され、至適量の抗体をその上清に与える。目的のモノクローナル抗体は好ましくは腹水化して得ることもできる。

本発明によるモノクローナル抗体は、メグー 4 に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的に、そのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも 7 以上のアミノ酸残基、望ましくは 10-20 アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すといわれている。したがって、配列番号：2 に記載されたアミノ酸配列から選択され、かつ連続する少なくとも 7 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるメグー 4 特異的なモノクローナル抗体といえる。

抗メグー 4 モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン

交換体（例えば DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテイン A または プロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を示すことができる。

このようにして得られたメグー 4 を認識する本発明によるモノクローナル抗体並びにポリクローナル抗体は、メサンギウム細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いてメグー 4 を測定する方法としては、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりメグー 4 を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識ヒト・メグー 4 と検体中のヒト由来メグー 4 を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のヒト由来メグー 4 を測定する競合法等を示すことができる。

サンドイッチ法によるメグー 4 の測定においては、まず、固定化抗体とメグー 4 とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体－メグー 4 標識化抗体を形成させる 2 ステップ法、もしくは固定化抗体、標識化抗体およびメグー 4 を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属などが挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、粒子状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固相化は、公知の化学結合法又は物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート及び N-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-

(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3- (2-ピリジルジチオ) プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエпитープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質は、免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。具体的には、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質、金属キレート等を使用することができる。好ましい標識酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。好ましい蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびオルトフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましい発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリン等が挙げられる。そして好ましい放射性物質としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、あるいは $^{35}\text{S}$ 等が挙げられる。

前記標識物質を抗体に結合する手法は公知である。具体的には、直接標識と間接標識が利用できる。直接標識としては、架橋剤によって抗体、あるいは抗体断片と標識とを化学的に共有結合する方法が一般的である。架橋剤としては、N,N'-オルトフェニレンジマレイミド、4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・

N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤を利用することができる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。この他、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンのような低分子ハプテンを結合させておき、これを認識する結合成分によって間接的に標識する方法を採用することもできる。ビオチンに対してはアビジンやストレプトアビジンが認識リガンドとして利用される。一方、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンについては、これらのハプテンを認識する抗体が標識される。抗体を標識する場合、西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いることができる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができるので有利である。また、抗体としては場合によっては、そのフラグメント、例えば Fab'、Fab、F(ab')<sub>2</sub> を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体はアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、防腐剤としてチメロサル(Thimerosal)等を、そして安定剤としてグリセリン等を加えて保存する。標識抗体は、凍結乾燥して冷暗所に保存することにより、より長期にわたって保存することができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用い、発色剤として 2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができる。酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は、基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用するこ

とができる。酵素に $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイニン-ジ- ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明は、また、前述のモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体を標識して、あるいは固相化してメグー4の免疫学的測定用試薬としたもの、更にはこの試薬に標識検出用の指示薬や対照試料等をキット化したものをも含むものである。

本発明におけるメグー4の測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、あるいは脳脊髄液等の体液等、メグー4、あるいはメグー4の前駆体や断片を含む生体試料であれば限定されない。

加えて本発明は、メグー4遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物に関する。ここでメグー4遺伝子とは、メグー4をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には、転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック動物は、メグー4の機能あるいは発現調節の研究、ヒトのメサンギウム細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、メグー4遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して人工的に上昇または下降するように修飾することができる。このような修飾は、メグー4遺伝子の転写の調節である。一方、エキソンの一部を欠損させたり、翻訳領域への点突然変異の導入により終止コドンへ置換することにより、タンパク質への翻訳を修飾することもできる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用い



て特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES 細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトさせた動物、点突然変異 DNA を導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む。

トランスジェニック動物の作製方法は、遺伝子と卵を混合させてリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第 4873191 号）、胚性幹細胞（ES 細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等が開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al. *Cell*, 57, 717, 1989）。

あるいはバクテリオファージ P1 の cre/loxP リコンビナーゼ系や *Saccharomyces cerevisiae* の FLP リコンビナーゼ系等の *in vivo* において部位特異的遺伝子組み換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば以下に示すようにして行われる。まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物は系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイント

ロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6 週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約 10～15 個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否か、尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により選択することができる。さらに、トランスジーンの発現を確認するため、ノザン法もしくは RT-PCR 法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロットリング法による検出も可能である。

本発明のノックアウトマウスは、マウスメグー 4 遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術で任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。胚性幹細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や 8 細胞期胚に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2 個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これら

ヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含むものである。

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使ったPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、メグー4のPSORT II (PSORT WWW Server、<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>)によるモチーフ検索の結果をまとめた図である。DNAの塩基は、翻訳開始位置を1として示した。

図2は、メグー4ペプチド抗体によるウエスタンブロット解析の結果を示す写真である。各レーンは、次の抗原に対応している。Mは分子量マーカーを示す。

レーン1：MBP発現大腸菌の細胞破砕液（抗メグー4ペプチドI g G）

レーン2：MBP-メグー4発現大腸菌の細胞破砕液（抗メグー4ペプチドI g G）

レーン3：発現大腸菌の細胞破砕液（正常ウサギI g G）

レーン4：MBP-メグー4発現大腸菌の細胞破砕液（正常ウサギI g G）

図3は、メグー4 cDNAをプローブとするFISH法による染色体の解析結果を示す蛍光顕微鏡写真である。白い矢印で示した部分が、メグー4 cDNAによって検出されたシグナルである。

図4は、メグー4遺伝子の局在部位である10p11.23-12.1.の位置を示すイデオグラムである。いずれのイデオグラムも国際命名法に基づいている。

### 発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

#### [実施例 1] ヒトメサングウム細胞の初代培養

58才の男性から摘出した正常なヒト腎臓から、ヒト糸球体腎臓メサングウム細胞を単離した。腎皮質を、無菌条件下で分離し、細分化し、いくつかの篩を通過させた。用いる篩は、段階的に孔径を小さくしていった。75~200 $\mu$ mの孔径の篩に捕捉された糸球体を、洗浄し、100 $\mu$ g/mlのコラゲナーゼ (Washington Biochemical 社製)と共に 37°Cで 20 分間インキュベートした。洗浄後、糸球体を、25mM HEPES、10% Nu-serum (Collaborative Biomedical Products 社, Bedford, MA) および抗生物質 (10 $\mu$ g/ml のペニシリン、ストレプトマイシン、およびファンギゾン) を含む培地 199 (Gibco BRL 社, Gaithersburg, MD) に再懸濁させ、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内でインキュベートした。3継代目に、メサングウム細胞を、典型的な形態学的特徴、トリプシン、ピューロマイシンおよび D-バリンに対する耐性、アクチン (Zymed Laboratories 社, San Francisco, CA)、抗 VLA(very late antigen)-1,3,5 (Immunotech) の免疫染色に対して陽性を示すこと、ならびに第 VIII 因子 (Dako 社, CA) の免疫染色に陰性を示すことなどの一連の基準により同定した。

#### [実施例 2] ヒト培養メサングウム細胞からの mRNA の単離

6 継代目に、グアニジンイソチオシアネート (GTC) 法を用いて、全 RNA をヒトメサングウム細胞から単離した。即ち、実施例 1 の細胞の血清を含む培養液中のメサングウム細胞コンフルエント培養物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、5.5mM GTC 溶液中で溶解させた。DNA は 18 ゲージの針を通過させることにより除

去した。核およびその他の細胞破片は  $5,000 \times g$  で 90 秒間遠心分離することにより沈殿させた。上清をセシウムトリフルオロアセテート (CsTFA) 層に注意深く載せ、 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $125,000 \times g$  で 24 時間遠心分離した。RNA ペレットを TE バッファーに溶解させた。オリゴ dT セルロースカラム (ファルマシア社) により、poly(A)<sup>+</sup>RNA を分離した。

### 〔実施例 3〕 3' 領域 cDNA ライブラリーの構築

poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型として、pUC19 を基礎とするベクタープライマー [Norrander J., et al., Gene, 26, 101-106 (1983)] を用いた cDNA 合成を行った。このベクタープライマー DNA は、HincII 末端、および T テールをもつ PstI 末端を有し、MboI 部位 (GATC) でダム・メチル化 (dam-methylated) されていた。第 2 鎖の合成の後、cDNA 配列、およびベクターの lacZ 遺伝子内の単一 BamHI 部位を、それぞれ MboI および BamHI で切断し、次に、低 DNA 濃度で環状化およびライゲーションを行った。ライゲーション混合物のうちの一部を大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体をランダムに選択し、簡単に加熱することにより個別に溶解させた。cDNA 挿入配列を、pUC19 クローニングサイトに隣接するプライマー ( 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' / 配列番号 : 3 および 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3' / 配列番号 : 4 ) を用いたペアード PCR により増幅させた。得られた短い二本鎖 DNA を、サイクル配列決定反応に用い、自動配列決定機で解析した。

### 〔実施例 4〕 メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子の単離

メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子を同定するため、本発明者は、大規模な DNA 配列決定およびコンピュータによるデータ処理を行った。このことにより、様々な異なる細胞および臓器における転写産物を同時に比較することができた (Y. Yasuda et al., Kidney International 53:154-158, 1998; K. Matsubara

et al., Gene. 135, 265 (1993); K. Okubo et al., Nat. Gen. 2, 173 (1992))。ヒト培養メサングウム細胞の 3' 領域 cDNA ライブラリーの大規模 DNA 配列決定を行い、ランダムに選択した 1836 個のクローンの部分配列を決定した。クローンの配列相同性を、相互に比較し、さらに FASTA プログラムを用いて DNA データバンク GenBank と比較した。様々な臓器および細胞からの mRNA をドットブロット解析することにより、メサングウム細胞で特異的に発現しているクローンが選択された。その結果、本発明者のメサングウム細胞 cDNA ライブラリーにおいてきわめて高い頻度で検出されるいくつかのクローンが得られた。

#### [実施例 5] ヒト・メサングウム細胞 $\lambda$ ZIPLox cDNA ライブラリーのスクリーニング

実施例 2 にしたがって調製した全 mRNA から、オリゴ dT プライマーとランダムプライマーとを用いて  $\lambda$ ZIPLox cDNA ライブラリーを合成した。ライブラリーの合成には市販の  $\lambda$ ZIPLox (Gibco BRL 社製、商品名  $\lambda$ ZIPLox EcoRI Arms) を利用した。実施例 4 で得たメサングウム細胞 cDNA ライブラリーで特に高頻度に検出される特定のクローンについて、そのインサートをプローブとして、この  $\lambda$ ZIPLox cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ポジティブクローン (2 クローン) について、挿入された遺伝子断片の塩基配列をジデオキシターミネーション法により決定した。

配列決定の結果、単離された 2 つのクローンのうちの 1 つは ORF の一部と 3' UTR-poly(A) を含み、もう一つが ORF の一部と 5' UTR を含むものであった。両者の塩基配列は一部で重複しており、アライメントにより配列番号: 1 に示す塩基配列を cDNA の塩基配列として決定した。また、この cDNA の塩基配列において最も長い ORF に基づく 773 アミノ酸残基を遺伝子産物の推定アミノ酸配列とした。このアミノ酸配列を持つタンパク質を本発明者はメグー 4 (Meg-4) と名づけた。

[実施例 6] メサングウム特異的遺伝子の機能解析 (1)

SwissProt データベースで FASTA プログラムによりアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、このメグー 4 が新規なタンパク質であることを確認した。またホモロジーを持つタンパク質としては、マウスの ATP-MP が確認された。メグー 4 と ATP-MP は、アミノ酸配列において 89.8%、cDNA の塩基配列においては 81.7% のホモロジーを持つ。また ATP-MP のアミノ酸配列における 55-58 位に対して、メグー 4 では 58 アミノ酸残基 (56-115) が挿入されていた。ATP-MP はマウスにおけるメグー 4 のホモログであることが推測された。

続いてメグー 4 のアミノ酸配列をモチーフ検索した。検索には、PSORT WWW Server(<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>)を利用した。検索結果を図 1 にまとめた。図 1 に示すように、メグー 4 は AAA タンパク質ファミリー(S.Patel,M.Latterich, trends in CELL BIOLOGY, Vol.8, 65-71, 1998)のモチーフを含んでいることが明らかとなった。具体的には、以下の部分に AAA タンパク質ファミリーに共通の複数のモチーフの存在が確認された。

379-386 : ATP 結合モチーフ

476-494 : 最小 AAA タンパク質モチーフ

434-438 : walker B モチーフ

600-603 : Zn 結合モチーフ

また、これらの事実に基づいて、上記推定アミノ酸配列がメグー 4 のアミノ酸配列であることが確認された。

AAA タンパク質に特徴的な AAA モチーフは、植物、バクテリア、そして哺乳類と多くの種属で保存されたアミノ酸配列である。そのため、AAA タンパク質ファミリーは基本的な細胞機能を支える重要な機能を持ったタンパク質であると推測される。したがって前記のような特性を持つメグー 4 がメサングウム細胞で高度に発現しているということは、このタンパク質が腎臓細胞の形態や機能維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

一方、腎メサングウム細胞ではいくつかのプロテアーゼが産生されており、それらが細胞機能の一部を担っていると考えられる。メグー 4 は、その遺伝子構造の特性からプロテアーゼ活性を有する可能性が考えられる。この事実も、腎メサングウム細胞の生理や病態生理にメグー 4 が深く関与する可能性を示している。

AAA タンパク質としては、ヒトではミトコンドリア・メタロプロテアーゼ (Casari G. et al. Cell, Vol. 93, 973-983, 1998) が報告されているが、メグー 4 とは AAA タンパク質モチーフ以外に相同性がほとんどみられない。その他、原核細胞 (E. coli) に由来する FtsH (Santos and Almeida, J. Bacteriol. 124, 1502-1507, 1975) や、酵母 (S. cerevisiae) から単離された YME1 (Thorsness P. E., Mol. Cell Biol. 5418-5426, 1993) も AAA タンパク質として報告されている。メグー 4 は、これらのタンパク質のヒトにおけるホモログの一つと言うこともできる。しかしいずれのタンパク質に対しても、アミノ酸配列上では AAA モチーフ以外では相同性の有る配列を見出すことはできない。

#### [実施例 7] メグー 4 の機能解析 (2) - 組織分布

メグー 4 のノーザンブロット解析は、以下のようにして行った。3' 領域 cDNA ライブラリー (実施例 3) のポジティブクローンのインサートを、ランダム DNA ラベリングによって RI 標識しプローブとして用いた。試料として以下の細胞から単離した poly(A)<sup>+</sup>RNA (2  $\mu$ g) を、2.2M ホルムアミドを含む 1% アガロースゲルで分離し、ニトロセルロースフィルターへ転写した。フィルターを Rapid Hyb 溶液 (Amersham 社, Arlington Heights, IL) 中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後に、60°C で、0.1  $\times$  SSPE/0.1% SDS という最終ストリンジェンシーで洗浄した。

ヒトの複数の初代培養細胞および組織のノーザンブロット、ヒトの癌細胞株のノーザンブロットのための試料は、Clontech (Palo Alto, CA) から購入した。初代培養細胞としては、メサングウム細胞、ヒト皮膚上皮細胞、ヒト腎皮質上皮細胞



胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、およびヒト平滑筋細胞の初代培養細胞由来の  $2\mu\text{g}$  の poly(A)<sup>+</sup>RNA を試料とした。ヒトの癌細胞株のノーザンブロットには、前骨髄球白血病 HL-60、HeLa 細胞 S3、慢性骨髄性白血病 K-562、リンパ芽球白血病 MOLT-4、Burkitt リンパ腫 Raji、大腸腺癌 SW480、肺癌 A549、および黒色腫 G361 由来の  $2\mu\text{g}$  の poly(A)<sup>+</sup>RNA を試料とした。組織のノーザンブロットには、心、脳、胎盤、肺、肝、骨格筋、腎、および脾由来の  $2\mu\text{g}$  の poly(A)<sup>+</sup>RNA を試料とした。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記と同様にして行った。結果は表 1 - 3 に示すとおりである。

表 1

初代培養細胞	
メサングウム細胞	+++
ヒト皮膚上皮細胞	++
ヒト腎皮質上皮細胞	+
ヒト臍帯静脈内皮細胞	±
ヒト平滑筋細胞	±

表 2

ヒト癌細胞株	
前骨髄球白血病 HL-60	±
HeLa 細胞 S3	+
慢性骨髄性白血病 K-562	+
リンパ芽球白血病 MOLT-4	±
Burkitt リンパ腫 Raji	-
大腸腺癌 SW480	+
肺癌 A549	+
黒色腫 G361	-

表 3

ヒト組織	
心	+
脳	+
胎盤	+
肺	±
肝	±
骨格筋	++
腎	+
膵	+

メグー 4 cDNA プローブを用いたノーザンブロット解析で、メサングウム培養細胞に単一の転写産物（約 4kb）が検出された。組織間の比較においては、ヒトの腎、心、脳、胎盤、骨格筋、あるいは膵等の組織で発現が観察され、肺と肝においては発現が弱く、逆にメサングウム細胞で特に高度に発現していることが確認された。培養癌細胞株においては顕著な発現は観察されなかった。

#### [実施例 8] メグー 4 フェノタイプの解析

実施例 6 において、本発明のメグー 4 タンパク質が、AAA タンパク質の一つとして報告された大腸菌 FtsH や酵母 YME1L のヒトにおけるホモログである可能性を指摘した。ところが、本出願の出願後にヒト FtsH として報告されたアミノ酸配列 (AF070656) は、メグー 4 の 225 位の Met から開始していた。更にその 3' 末端においては翻訳フレームがずれていた。また、やはり本出願の出願後に報告されたマウス FtsH のアミノ酸配列の 55 - 58 位に相当する領域 sse-PV-lnlr において、本発明のメグー 4 では 59 アミノ酸の挿入と置換 sse-(59aa の挿入と置換)-lnlr が見られた。これらの情報に基づいて、ヒトにおけるメグー 4 のフェノタイプの単離を試みた。

すなわち、実施例 5 で得たヒト・メサングウム細胞入 ZIPLox cDNA ライブラリーをテンプレートとして、次のプライマーセットを用いて PCR 法による cDNA の増幅を行った。このプライマーセットは、メグー 4 のアミノ酸配列（配列番号：2）

における 56～116 位をコードする塩基配列の増幅を行うように設計されている。

センスプライマー(5'-end)

5'-atgttttctt tgtcgagcac ggtgcaaccc c-3' / 配列番号 : 5

アンチセンスプライマー(AS754)

5'-tctcggaggt agactggaga cgtcgtgtcc t-3' / 配列番号 : 6

その結果、得られた増幅生成物に、配列番号 : 7 に示す塩基配列からなる cDNA の存在が確認された。この塩基配列によってコードされる推定アミノ酸配列を配列番号 : 8 に示した。配列番号 : 8 のアミノ酸配列では、メグー 4 の 56～116 位に相当する領域のアミノ酸配列が sse-PS-lnlr となっていた。更に、本願の出願後に報告されたヒト YME1L(Homo sapiens mRNA for ATP-dependent metalloprotease YME1L.)のアミノ酸配列(AJ132637)は、配列番号 : 2 に示すメグー 4 と 98.3% の相同性を持ち、配列番号 : 8 における 55～58 位に相当する部分のアミノ酸配列が sse-PS-lnlr であることが明らかとなった。これらの知見をまとめると、一連のアミノ酸配列の関係を、次のように示すことができる。

配列番号 : 2 (メグー 4)	sse-...59aa...-lnlr
マウス FtsH	sse- PV -lnlr
配列番号 : 8 (メグー 4 フェノタイプ)	sse- PS -lnlr
ヒト YME1L(AJ132637)	sse- PS -lnlr

以上のことから、本発明のヒト・メグー 4 は、YME1L と同様の機能を持つことが推定される。

#### [実施例 9] メグー 4 の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体の製造

他の AAA ファミリーとの相同性が低く、かつ親水性を有する領域を免疫原として利用し、メグー 4 に対するポリクローナル抗体を製造した。以下のアミノ酸配列からなるペプチドの N 末端または C 末端にシステインを含有するペプチドを固

相ペプチド法により合成した。

N末端からの位置      アミノ酸配列

574-593      KDKILMGPERRSVEIDNKNK (配列番号：9)

各合成ペプチドとアジュバント (D i f c o 製) と充分混和し乳化させ、ウサギ皮下に投与した。初回免疫 (20  $\mu$ g/羽) 後3週間後に2回目 (50  $\mu$ g/羽) の免疫を行い、以後2週間毎に4回免疫 (50、100、200  $\mu$ g/羽) を行った。アジュバントは初回のみフロインド完全アジュバントで、2回目以降はフロインド不完全アジュバントを用いた。41日後、55日後、採血で得た血清が合成ペプチドと反応することを確認するため、血清の抗体価を酵素免疫測定法 (E L I S A) により評価した。抗原 50 ng/well を固相化した96穴プレートに連続的に希釈した抗血清を各ウェルに100  $\mu$ L 加えて一次反応を行い、洗浄後、二次反応としてHRP結合ヤギ抗ウサギIgG (カッペルプロダクト製) を反応させた。洗浄後、基質としてオルトフェニレンジアミン (和光純薬製) を加えて発色させ吸光度492nmで測定し、抗体価が上昇していることを確認した。

[実施例10] メグー4の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体の精製法

メグー4の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体は、公知の方法 (細胞工学別冊 実験プロトコルシリーズ 抗ペプチド実験プロトコル、秀潤社) に従ってアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。操作は、次のとおりである。

すなわち、メグー4を免疫し抗体価の上昇したウサギ血清をPBS (-) で希釈したのち、IgG精製用protein Gカラムを用いてアフィニティー精製した。得られた精製抗体はウエスタンブロットによりメグー4タンパク質融合タンパク質と反応することを確認し、メグー4に特異的であることを証明した (実施例11)。

[実施例11] ウサギポリクローナル抗メグー4ペプチドIgGの反応性の検討

MBP-メグー4、並びにMBP単独発現大腸菌破碎液を抗原として用い、メグー4ペプチドを免疫原とするウサギIgGの反応性を確認した。MBP-メグー4は次のように調製した。すなわち、まず配列番号：1に示すメグシン遺伝子の塩基配列に基づいてそのコード領域をPCRによって増幅した。この増幅産物を、マルトース結合タンパク質融合タンパク質発現用ベクター、pMAL-c (New England Biolab社)に組み込むことによってMBPとメグシンタンパク質との融合タンパク質を発現するベクターを得た。このベクターで大腸菌を形質転換し、その細胞破碎液をMBP-メグー4とした。

それぞれのタンパク質溶液を等量のサンプルバッファー(0.25%トリス-HCl、2%SDS、30%グリセリン、10%β-メルカプトエタノール、0.025%ブロモフェノールブルー)(第一化学薬品製)で処理し、5分間100℃で加熱して試料とした。得られた試料を、ゲル濃度4-20%のグラジエントゲル(第一化学薬品製)を用いてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)(Laemmli, U.K., Nature, 第227巻, 680-685頁, 1970年)により分離した。

SDS-PAGEで分離したタンパク質を、ブロッティング溶液(25mMトリス-HCl、192mMグリシン、20%メタノール、pH8.3)を用いて100Vの定電圧で1時間、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜(バイオ・ラッド製)にブロッティングした。ブロッティングしたPVDF膜を蒸留水で洗浄後、5%ブロックエースのTTBS溶液中で3時間ブロッキングした。次に、PVDF膜をTTBS(20mMトリス、500mMのNaCl、0.05%Tween 20、pH7.5)で洗浄した後、TTBSで希釈した1次抗体であるウサギポリクロール抗メグー4ペプチドIgGの溶液と4℃で一夜反応させた。次に、アンプリファイドアルカリフォスファターゼイミュンブロットキット(バイオ・ラッド製)を用いて検出した。すなわち、TTBSで希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギIgGと室温で1時間インキュベートした後、あらかじめ室温でストレ

プトアビジンとビオチン標識アルカリフォスファターゼを1時間インキュベートして調製したストレプトアビジン-ビオチン標識アルカリフォスファターゼのコンプレックスを反応させた。PVD F膜をTTBSで洗浄し、基質(nitro blue tetrazoliumと5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine 塩の溶液)と室温で約30分間インキュベートすることにより、1次抗体に結合された抗体を可視化した。蒸留水で十分反応させることにより、反応を停止させた。

結果を図2に示した。実施例10で得た本発明によるメグー4に対するポリクローナル抗体で、MBP-メグー4に相当するバンドが確認できた。したがってこのポリクローナル抗体は、メグー4を特異的に認識する抗体であることが示された。

#### [実施例12] FISH法によるメグー4遺伝子の染色体における局在の解析

クローンF960のDNAを、ニックトランスレーション法によってジゴキシゲニン dUTP で標識した。クローンF960は、ヒトゲノムの Bac (bacterial artificial chromosome)ライブラリーを、メグー4特異プローブでスクリーニングして得られた陽性クローンである。Bac ライブラリーのスクリーニングに用いたメグー4特異プローブは、cDNA の 5'-領域 (0-644 nt)をインサートとして含む ZIPLoxcDNA クローンの kpn-I /Sca I 消化断片に相当する断片である。

標識プローブを切断したヒトDNAで処理し、次いで正常な中期のヒト染色体とハイブリダイズさせた。ヒト染色体は、PHA刺激した末梢血リンパ球を、50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、および2×SSCを含む溶液で処理することによって得た。ハイブリダイゼーションシグナルは、DAPIによるカウンスティニングの後に、フルオレセイン結合抗ジゴキシゲニン抗体を反応させることにより検出した。

この実験により、サイズ、形態上の特徴、あるいはバンドパターンに基づいて10番染色体と思われるグループC染色体の短腕に特異的なシグナルが観察され

た（図3）。

次に、10q22（長腕）にマッピングされている anonymous プローブ、10番染色体のセントロメア特異プローブ、およびクローンF960との共染色を行った。この実験によって、長腕と短腕に特異的なシグナルを比較することができる。10番染色体特異的な10のプローブを用いた解析によれば、F960は染色体10pのセントロメアからテロメアに対して23%の距離にマッピングされた。この領域は10p11.23-12.1.に相当する。全部で80の中期細胞を解析し、うち75でF960に特異的なシグナルが観察された。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、メサンギウム細胞に高頻度に発現している DNA、該 DNA のコードするタンパク質、該タンパク質に結合する抗体等が提供された。これらはメサンギウム細胞に特異的な生理活性に深く関与していると推測され、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

具体的には、たとえばメグー4の人為的な調節によって、糸球体腎炎の発症や進展を制御できる可能性がある。あるいはメサンギウム細胞や体液中のメグー4タンパク質や mRNA の定量によって、糸球体腎炎などの腎疾患の診断が可能となることが期待できる。糸球体腎炎ではメサンギウム領域の機能異常が見られ、メサンギウム細胞の増殖、あるいは細胞からのマトリックス基質の産生亢進が起きている。これらの病態にメグー4が関与している可能性は十分に考えられる。

本発明によるメグー4は、メサンギウム細胞で高度に発現しているという点では、本発明者が先に報告したメグシンと共通の特徴を備えている。しかしながら本発明によるメグー4はAAAタンパク質ファミリー中のATP-MP群に属すると考え

られるに対して、メグシンはプロテアーゼインヒビターである SERPIN スーパーファミリーとの相同性を持つタンパク質である。また本発明によるメグー 4 が比較的広範囲な組織において発現が観察されている点は、メグシンのメサンギウム細胞に特異的に発現しているという特徴と相違する。したがって本発明によるメグー 4 は、メサンギウム細胞の機能を支える重要なタンパク質である可能性を持っている。このような重要なタンパク質の存在を明らかにした本発明の意義は大きい。



## 請求の範囲

1. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。
2. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して、90%以上のホモロジーを持つアミノ酸配列からなる請求項1に記載のタンパク質。
3. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のタンパク質。
4. 請求項1に記載のタンパク質をコードするDNA。
5. 配列番号：1に記載の塩基配列に対して、85%以上のホモロジーを持つ塩基配列からなる請求項4に記載のDNA。
6. 配列番号：1に記載の塩基配列におけるタンパク質コード領域を含む請求項5に記載のDNA。
7. 配列番号：1に記載の塩基配列を持つDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、請求項1に記載のタンパク質をコードするDNA。
8. 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA、またはその相補鎖と特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNA。
9. 請求項6に記載のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。
10. 請求項4、請求項5、請求項6、および請求項7のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。
11. 請求項4、請求項5、請求項6、および請求項7のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。
12. 請求項11に記載の形質転換細胞を培養し、請求項4、請求項5、請求項6、および請求項7のいずれかに記載のDNAの発現産物を回収することを特

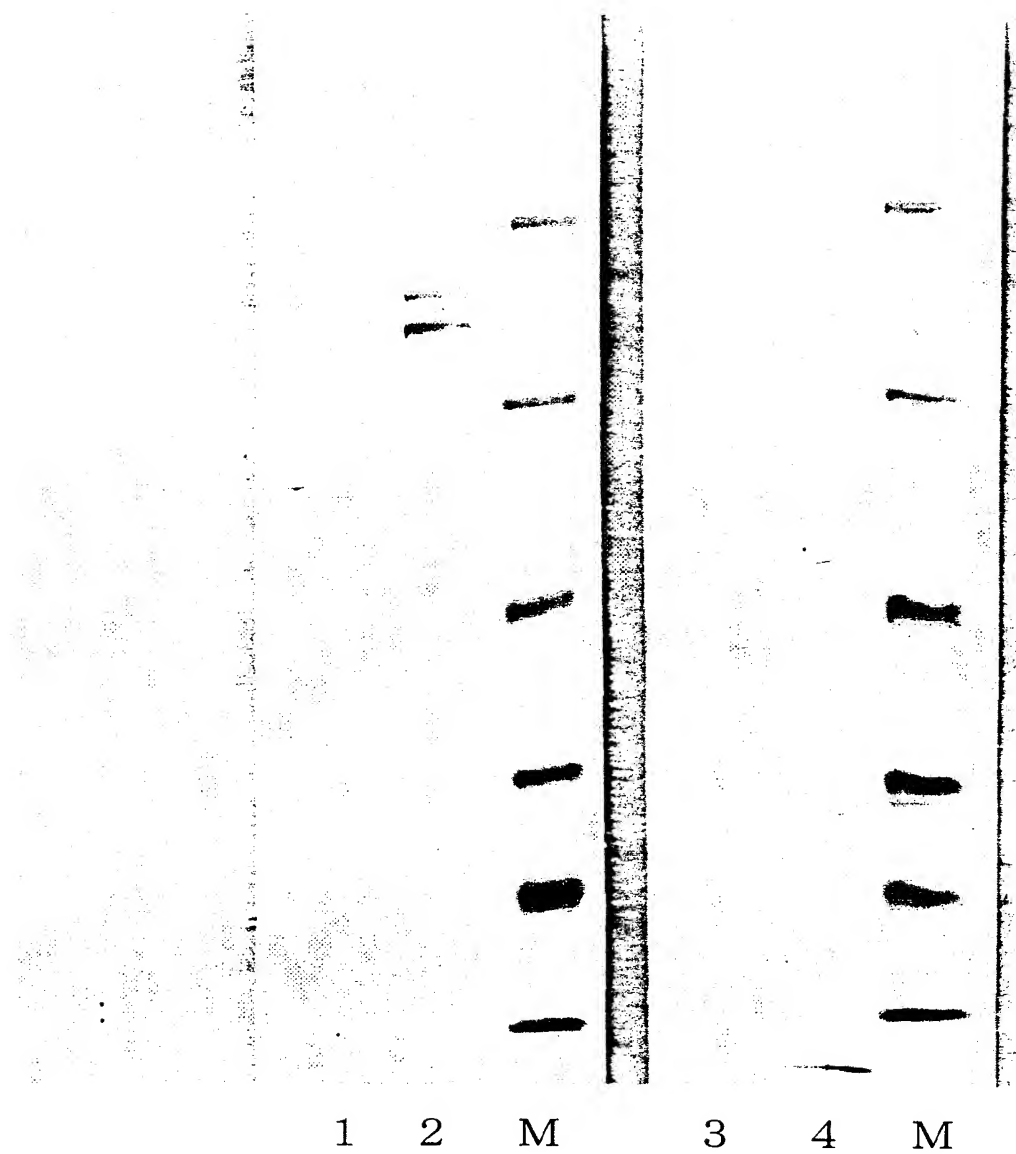
徴とする、請求項 1 に記載のタンパク質の製造方法。

13. 請求項 1 に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。
14. 配列番号：2 のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質を認識する請求項 13 に記載の抗体。
15. 抗体がモノクローナル抗体である請求項 14 に記載の抗体。
16. 請求項 14 または請求項 15 に記載の抗体と請求項 2 に記載のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて請求項 3 に記載のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。
17. 請求項 14 または請求項 15 に記載の抗体を含む請求項 3 に記載のタンパク質またはその断片の免疫学的測定用試薬。
18. 生体試料中に含まれる請求項 3 に記載のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎症を検出する方法。
19. メグー 4 をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
20. 非ヒト脊椎動物がマウスである請求項 19 に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
21. メグー 4 をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである請求項 20 に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。



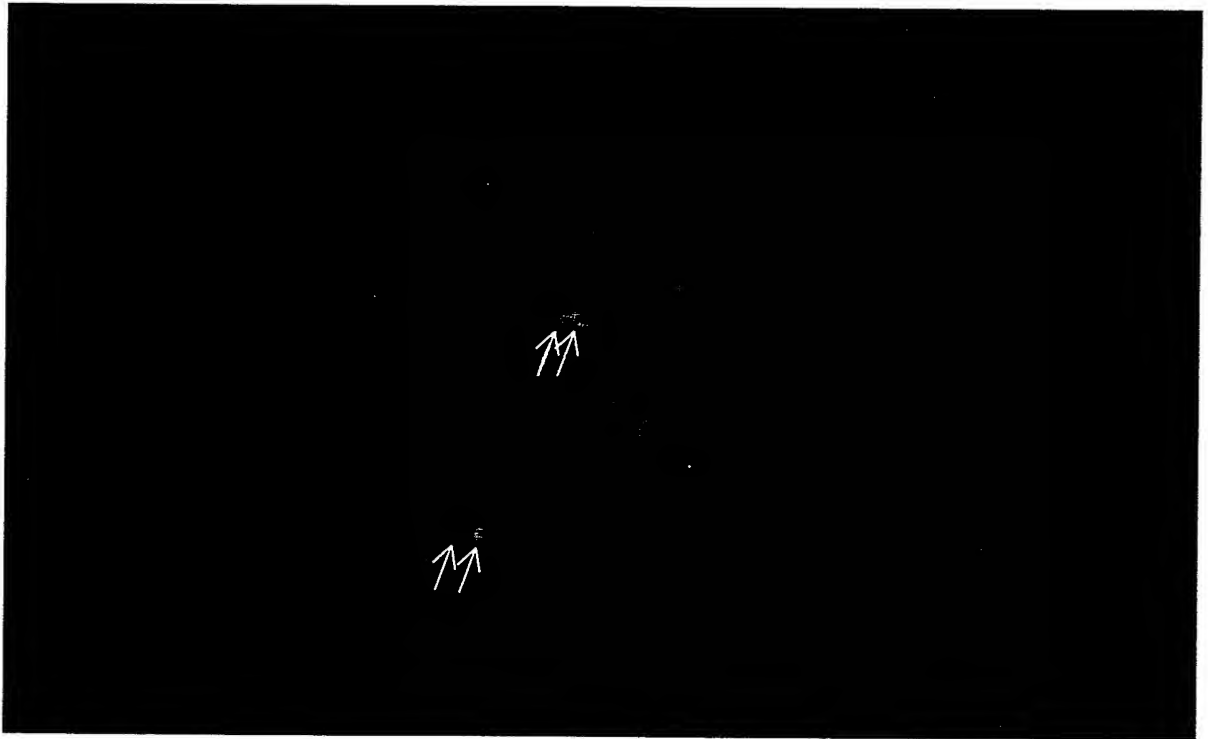
2 / 4

図 2



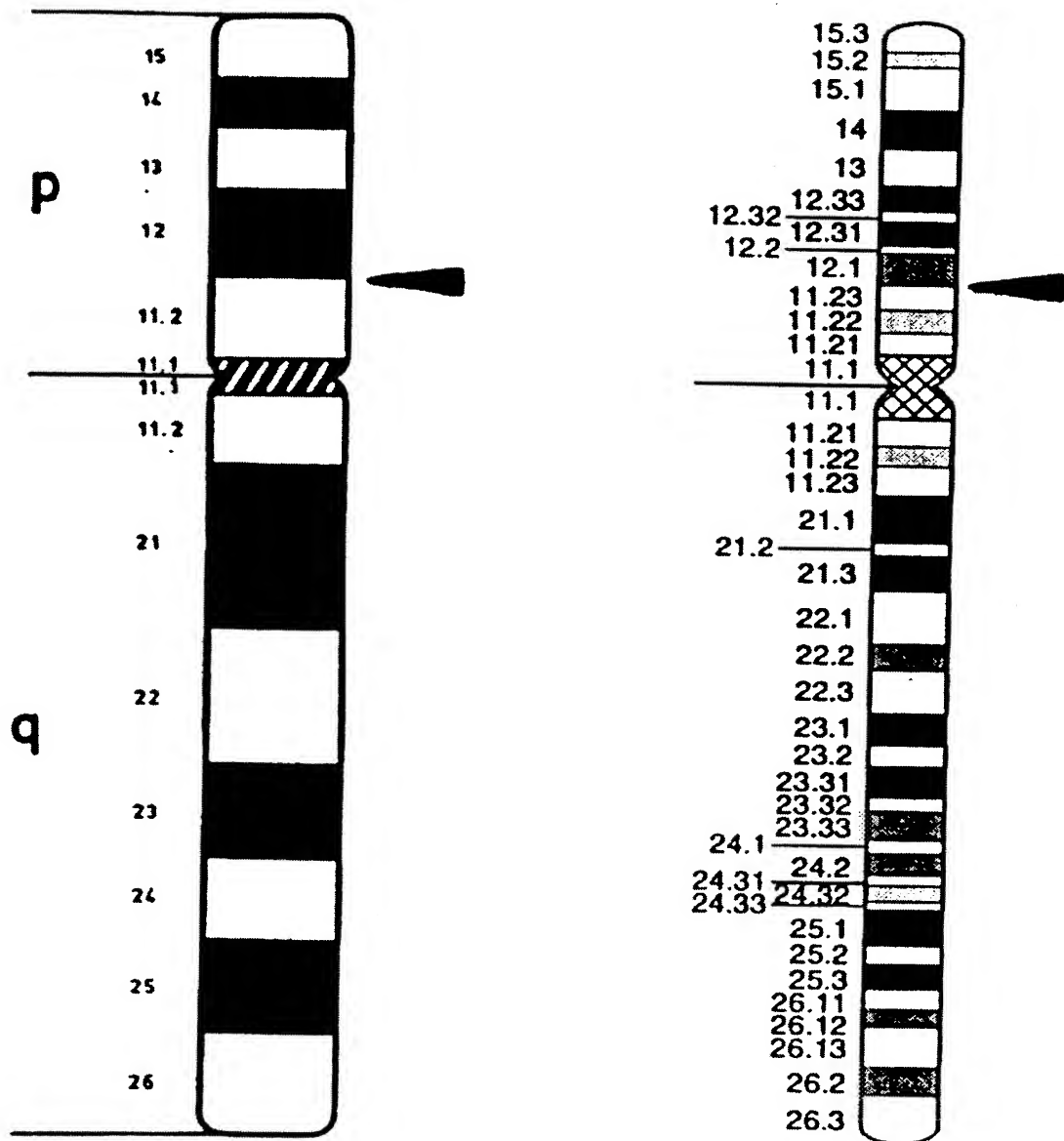
3 / 4

☒ 3



4 / 4

图 4



10

1/14

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, TOSHIO  
KUROKAWA, KIYOSHI

<120> Meg-4 protein

<130> KRK-001PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-021543

<151> 1999-01-29

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3941

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

2/14

ctatagggaa agctggtaag cctgcaggta ccggtccgga aattcgoggc cgcgtcgacg 60  
ggtgaggtcg ctgagggccc gccgggggtg aggtcgctga gggcccgccg gagatgtttt 120  
ccttgctgag cacgggtcaa ccccagtta cagttcctct gagtcattct atcaatgcct 180  
tccatacacc aaaaaacact tctgtttctc tcagtggagt gtcagtttct caaaaccagc 240  
atcgagatgt agttcctgag catgaggctc ccagcagtga gtgtatgttc agtgacttcc 300  
tgacgaagct taacattgtt tcaatcgga aaggaaaaat attcgaaggg tacagatcca 360  
tgttcattga gccagcaaaa aggatgaaga agagcttgga cacaaccgat aactggcaca 420  
tccgtccaga acccttctcc ctctcaatcc ctcttccact taacttaagg gacottggat 480  
tatctgaatt aaaaattgga cagattgac agctggtaga aaatctactt cctggatttt 540  
gtaaaggcaa aaacatttct tccattggc atacatccca tgtctctgca caatccttct 600  
ttgaaaataa atatggtaac ttagatatat ttagtacatt acgttcctct tgcttgatc 660  
gacatcattc aagagctctt caaagcattt gtccagatct tcagtactgg ccagttttca 720  
tacagtctcg gggttttaaa actttgaaat caaggacacg acgtctccag tctacctccg 780  
agagattagc tgaaacacag aatatagcgc catcattcgt gaaggggttt cttttgcggg 840  
acagaggatc agatgttgag agtttgga aactcatgaa aaccaaaaat atacctgaag 900  
ctcaccaaga tgcattttaa actggttttg cggaagggtt totgaaagct caagcactca 960  
cacaaaaaac caatgattcc ctaaggcgaa ccgctctgat totcttcgtt ctgctgctat 1020  
tcggcattta tggacttcta aaaaacccat ttttatctgt ccgcttcggg acaacaacag 1080  
ggcttgattc tgcagtagat cctgtccaga tgaaaaatgt cacctttgaa catgttaaag 1140  
gggtggagga agctaaacaa gaattacagg aagttgttga attottgaaa aatccacaaa 1200  
aatttactat tottgagggt aaacttccaa aaggaattct tttagttgga ccccaggga 1260  
ctggaaagac acttcttgcc cgagctgtgg cgggagaagc tgatgttcc ttttattatg 1320  
cttctggatc cgaatttgat gagatgtttg tgggtgtggg agccagccgt atcagaaatc 1380  
tttttaggga agcaaaggcg aatgctcctt gtgttatatt tattgatgaa ttagattctg 1440  
ttggtgggaa gagaattgaa tctccaatgc atccatattc aaggcagacc ataaatcaac 1500  
ttcttgctga aatggatggt tttaaaccac atgaaggagt tatcataata ggagccacaa 1560



3/14

acttcccaga ggcattagat aatgccttaa tacgtcctgg tcgttttgac atgcaagtta 1620  
cagttccaag gccagatgta aaaggtcgaa cagaaatfff gaaatggat ctcrataaaw 1680  
taaagtttga tcaatccgtt gatccagaaa ttatagctcg aggtactgtt ggcttttccg 1740  
gagcagagtt ggagaatcct gtgaaccarg ctgcattaaa agcagctgtt gatggaaaag 1800  
aaatggttac catgaaggag ctggagtttt ccaaagacaa aattctaag gggcctgaaa 1860  
gaagaagtgt ggaaattgat aacaaaaaca aaaccatcac agcatatcat gaatctggtc 1920  
atgccattat tgcatattac acaaaagatg caatgcctat caacaaagct acaatcatgc 1980  
cacggggggcc aacgcttgga catgtgtccc tgttacctga gaatgacaga tggaatgaaa 2040  
ctagagccca gctgcttgca caaatggatg ttagtatggg aggaagagtg gcagaggagc 2100  
ttatatattg aaccgaccat attacaacag gtgcttccag tgattttgat aatgccacta 2160  
aaatagcaaa goggatgggt accaaatttg gaatgagtga aaagcttgga gttatgacct 2220  
acagtgatac agggaaacta agtccagaaa cccaatctgc catogaacaa gaaataagaa 2280  
tccttctaag ggactcatat gaacgagcaa aacatatcct gaaaactcat gcaaaggagc 2340  
ataagaatct cgcagaagct ttattgacct atgagacttt ggatgccaaa gagattcaaa 2400  
ttgttcttga ggggaaaaag ttggaagtga gatgataact ctcttgatat ggatgottgc 2460  
tggttttatt gcaagaatat aagtagcatt gcagtagtct acttttacia cgctttcccc 2520  
tcattcttga tgtagtgtaa ttgaagggtg tgaaatgctt tgtcaatcat ttgtcacatt 2580  
tatccagttt gggttattct cattatgaca cctattgcaa attagcatcc catggcaaat 2640  
atattttgaa aaaataaaga actatcagga ttgaaaacag ctcttttgag gaatgtcaat 2700  
tagttattaa gttgaaagta attaagtatt ttatgtttgg ttactctact agatttgata 2760  
aaaattgtgc ctttagcctt ctatatacat cagtggaaac ttaagatgca gtaattatgt 2820  
tcagattga ccatgaataa aatatttttt aatctaaatg tagagaagtt gggattaaaa 2880  
gcagcctcgg aaacacagag ccaggaatat agccttttgg catggtgcca tggctcacat 2940  
ctgtaatccc agcacttttg gaggtgagg cgggtggatt gcttgaggcc aggagttcga 3000  
gaccagcctg gccaacgtgg tgaaacgctg tctctactaa aatacaaaaa aatagggctg 3060  
ggcgcggttg ctacgcctg taatcccagc acttttcaga ggccaaggcg ggcaaatcac 3120

4/14

ctgaggtcaa gagtttgaga ccagcctggc caacatggtg aaaccccatc tctactaaac 3180  
 atgcaaaaat tacctgggca tgggtggcagg tgcttataat cccagctact ctggggggcca 3240  
 aggcaggaga attgcttgag cctgggagat ggaggttgca gtgagctgag atcatgccac 3300  
 tgcactccag cctgggcaac agagcaagac tctgcctcaa aaaaaaatta aaataaattt 3360  
 aaatacaaaa aaaaatagcc aggtgtgggg tgcatgcctg gaatcccagc tacttgagag 3420  
 gctgaggcac gagaattgct tgaaccagg aggtggaggt tgcagtgagc caagatcaca 3480  
 ggagccactg cactccagcc tgggtgacag agtgagactc tgtctcaaaa aaaaaattaa 3540  
 ataaattatt ataaccttc agaaatgctg tgtgcatttt catgttcttt ttttagcat 3600  
 tactgtcact ctccctaagc aatgtactt cagagaagca gtattttgtt aaataaatac 3660  
 ataacctcat tctgaataat gtccctcatt ttgactataa ctgtgcttgg tttcaaaagc 3720  
 aaaattaaac aaaaatctca gtccctccg aagtgaactt tgtgttaccg tgcgtcagaa 3780  
 atgccaagtt gtgtttactt ttcattcaga ttttgtgaat atgaacatgc tgttatagga 3840  
 tctacagatg aatatttaac tcaatagaaa aattatttta gaacacattg tattggtatt 3900  
 tacaaccaga ttatattctt gacgttgact tcattaaaat t 3941

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 773

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Phe Ser Leu Ser Ser Thr Val Gln Pro Gln Phe Thr Val Pro Leu

1

5

10

15

Ser His Leu Ile Asn Ala Phe His Thr Pro Lys Asn Thr Ser Val Ser

20

25

30

5/14

Leu Ser Gly Val Ser Val Ser Gln Asn Gln His Arg Asp Val Val Pro  
35 40 45

Glu His Glu Ala Pro Ser Ser Glu Cys Met Phe Ser Asp Phe Leu Thr  
50 55 60

Lys Leu Asn Ile Val Ser Ile Gly Lys Gly Lys Ile Phe Glu Gly Tyr  
65 70 75 80

Arg Ser Met Phe Met Glu Pro Ala Lys Arg Met Lys Lys Ser Leu Asp  
85 90 95

Thr Thr Asp Asn Trp His Ile Arg Pro Glu Pro Phe Ser Leu Ser Ile  
100 105 110

Pro Pro Ser Leu Asn Leu Arg Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Lys Ile  
115 120 125

Gly Gln Ile Asp Gln Leu Val Glu Asn Leu Leu Pro Gly Phe Cys Lys  
130 135 140

Gly Lys Asn Ile Ser Ser His Trp His Thr Ser His Val Ser Ala Gln  
145 150 155 160

Ser Phe Phe Glu Asn Lys Tyr Gly Asn Leu Asp Ile Phe Ser Thr Leu

6/14

165

170

175

Arg Ser Ser Cys Leu Tyr Arg His His Ser Arg Ala Leu Gln Ser Ile

180

185

190

Cys Ser Asp Leu Gln Tyr Trp Pro Val Phe Ile Gln Ser Arg Gly Phe

195

200

205

Lys Thr Leu Lys Ser Arg Thr Arg Arg Leu Gln Ser Thr Ser Glu Arg

210

215

220

Leu Ala Glu Thr Gln Asn Ile Ala Pro Ser Phe Val Lys Gly Phe Leu

225

230

235

240

Leu Arg Asp Arg Gly Ser Asp Val Glu Ser Leu Asp Lys Leu Met Lys

245

250

255

Thr Lys Asn Ile Pro Glu Ala His Gln Asp Ala Phe Lys Thr Gly Phe

260

265

270

Ala Glu Gly Phe Leu Lys Ala Gln Ala Leu Thr Gln Lys Thr Asn Asp

275

280

285

Ser Leu Arg Arg Thr Arg Leu Ile Leu Phe Val Leu Leu Leu Phe Gly

290

295

300

7/14

Ile Tyr Gly Leu Leu Lys Asn Pro Phe Leu Ser Val Arg Phe Arg Thr  
305 310 315 320

Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ala Val Asp Pro Val Gln Met Lys Asn Val  
325 330 335

Thr Phe Glu His Val Lys Gly Val Glu Glu Ala Lys Gln Glu Leu Gln  
340 345 350

Glu Val Val Glu Phe Leu Lys Asn Pro Gln Lys Phe Thr Ile Leu Gly  
355 360 365

Gly Lys Leu Pro Lys Gly Ile Leu Leu Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly  
370 375 380

Lys Thr Leu Leu Ala Arg Ala Val Ala Gly Glu Ala Asp Val Pro Phe  
385 390 395 400

Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Glu Phe Asp Glu Met Phe Val Gly Val Gly  
405 410 415

Ala Ser Arg Ile Arg Asn Leu Phe Arg Glu Ala Lys Ala Asn Ala Pro  
420 425 430

Cys Val Ile Phe Ile Asp Glu Leu Asp Ser Val Gly Gly Lys Arg Ile  
435 440 445

8/14

Glu Ser Pro Met His Pro Tyr Ser Arg Gln Thr Ile Asn Gln Leu Leu

450

455

460

Ala Glu Met Asp Gly Phe Lys Pro Asn Glu Gly Val Ile Ile Ile Gly

465

470

475

480

Ala Thr Asn Phe Pro Glu Ala Leu Asp Asn Ala Leu Ile Arg Pro Gly

485

490

495

Arg Phe Asp Met Gln Val Thr Val Pro Arg Pro Asp Val Lys Gly Arg

500

505

510

Thr Glu Ile Leu Lys Trp Tyr Leu Asx Lys Xaa Lys Phe Asp Gln Ser

515

520

525

Val Asp Pro Glu Ile Ile Ala Arg Gly Thr Val Gly Phe Ser Gly Ala

530

535

540

Glu Leu Glu Asn Leu Val Asn Gln Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp

545

550

555

560

Gly Lys Glu Met Val Thr Met Lys Glu Leu Glu Phe Ser Lys Asp Lys

565

570

575

Ile Leu Met Gly Pro Glu Arg Arg Ser Val Glu Ile Asp Asn Lys Asn

9/14

580

585

590

Lys Thr Ile Thr Ala Tyr His Glu Ser Gly His Ala Ile Ile Ala Tyr

595

600

605

Tyr Thr Lys Asp Ala Met Pro Ile Asn Lys Ala Thr Ile Met Pro Arg

610

615

620

Gly Pro Thr Leu Gly His Val Ser Leu Leu Pro Glu Asn Asp Arg Trp

625

630

635

640

Asn Glu Thr Arg Ala Gln Leu Leu Ala Gln Met Asp Val Ser Met Gly

645

650

655

Gly Arg Val Ala Glu Glu Leu Ile Phe Gly Thr Asp His Ile Thr Thr

660

665

670

Gly Ala Ser Ser Asp Phe Asp Asn Ala Thr Lys Ile Ala Lys Arg Met

675

680

685

Val Thr Lys Phe Gly Met Ser Glu Lys Leu Gly Val Met Thr Tyr Ser

690

695

700

Asp Thr Gly Lys Leu Ser Pro Glu Thr Gln Ser Ala Ile Glu Gln Glu

705

710

715

720

10/14

Ile Arg Ile Leu Leu Arg Asp Ser Tyr Glu Arg Ala Lys His Ile Leu

725

730

735

Lys Thr His Ala Lys Glu His Lys Asn Leu Ala Glu Ala Leu Leu Thr

740

745

750

Tyr Glu Thr Leu Asp Ala Lys Glu Ile Gln Ile Val Leu Glu Gly Lys

755

760

765

Lys Leu Glu Val Arg

770

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 3

tgtaaaacga cggccagt

18

&lt;210&gt; 4



11/14

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 4

accatgatta cgccaagctt g

21

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 5

atgttttcct tgtcgagcac ggtgcaaccc c

31

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

12/14

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 6

tctcggaggt agactggaga cgtcgtgtcc t

31

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 499

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

atgttttcct tgtcagcac ggtgcaacc cagtttacag ttctctgag tcatctcatc 60  
aatgccttcc atacaccaa aaacacttct gtttctctca gtggagtgtc agtttctcaa 120  
aaccagcatc gagatgtagt tcttgagcat gaggtccca gcagtgagcc ttcaactaac 180  
ttaagggacc ttggattatc tgaattaaaa attggacaga ttgatcagct ggtagaaaat 240  
ctacttcctg gatattgtta aggcaaaaac atttcttccc attggcatac atcccatgtc 300  
tctgcacaat ccttctttga aaataaatat ggtaacttag atatatttag tacattacgt 360  
tcctcttgct tgtatcgaca tcattcaaga gctcttcaaa gcatttggtc agatcttcag 420  
tactggccag tttcataca gtctcgggggt tttaaaactt tgaaatcaag gacacgacgt 480  
ctccagtcta cctccgaga 499

&lt;210&gt; 8

13/14

&lt;211&gt; 166

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Met Phe Ser Leu Ser Ser Thr Val Gln Pro Gln Phe Thr Val Pro Leu  
1 5 10 15

Ser His Leu Ile Asn Ala Phe His Thr Pro Lys Asn Thr Ser Val Ser  
20 25 30

Leu Ser Gly Val Ser Val Ser Gln Asn Gln His Arg Asp Val Val Pro  
35 40 45

Glu His Glu Ala Pro Ser Ser Glu Pro Ser Leu Asn Leu Arg Asp Leu  
50 55 60

Gly Leu Ser Glu Leu Lys Ile Gly Gln Ile Asp Gln Leu Val Glu Asn  
65 70 75 80

Leu Leu Pro Gly Phe Cys Lys Gly Lys Asn Ile Ser Ser His Trp His  
85 90 95

Thr Ser His Val Ser Ala Gln Ser Phe Phe Glu Asn Lys Tyr Gly Asn  
100 105 110

14/14

Leu Asp Ile Phe Ser Thr Leu Arg Ser Ser Cys Leu Tyr Arg His His

115

120

125

Ser Arg Ala Leu Gln Ser Ile Cys Ser Asp Leu Gln Tyr Trp Pro Val

130

135

140

Phe Ile Gln Ser Arg Gly Phe Lys Thr Leu Lys Ser Arg Thr Arg Arg

145

150

155

160

Leu Gln Ser Thr Ser Glu

165

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide

&lt;400&gt; 9

Lys Asp Lys Ile Leu Met Gly Pro Glu Arg Arg Ser Val Glu Ile Asp

1

5

10

15

Asn Lys Asn Lys

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00413

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12Q1/68, C12N5/00, C07K16/18, G01N33/53, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12Q1/68, C12N5/00, C07K16/18, G01N33/53, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
Swissprot/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO, 98/56804, A1 (Human Genome Science, Inc.), 17 December, 1998 (17.12.98), sequence No. 32,235, p.22-23, etc. & AU, 9880669, A	1-17,19-21 18
X A	WO, 98/22501, A1 (Genetics Institute, Inc.), 28 May, 1998 (28.05.98), sequence No. 16,17, p.20-21, etc. & AU, 9852024, A & EP, 941242, A2	1-17,19-21 18
X A	WO, 98/45436, A1 (Genetics Institute, Inc.), 15 October, 1998 (15.10.98), sequence No. 67, etc. & AU, 9868910, A & EP, 973896, A2	8,9 1-7,10-21
A	J.Clin.Invest. Vol.102 No.4 (1998) Miyata T.et al."A Mesangium-predominant Gene, Megsin, Is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy"p.828-836	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 March, 2000 (29.03.00)

Date of mailing of the international search report  
11 April, 2000 (11.04.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12Q1/68, C12N5/00, C07K16/18, G01N33/53, A01K67/027

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12Q1/68, C12N5/00, C07K16/18, G01N33/53, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

Swissprot/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO, 98/56804, A1 (Human Genome Science, Inc.) 17. 12月. 1998 (17. 12. 98) 配列番号32, 235 p. 22-23等 & AU, 9880669, A	<u>1-17, 19-21</u> 18
<u>X</u> A	WO, 98/22501, A1 (Genetics Institute, Inc.) 28. 5月. 1998 (28. 05. 98) 配列番号16, 17 p. 20-21等 & AU, 9852024, A & EP, 941242, A2	<u>1-17, 19-21</u> 18
<u>X</u> A	WO, 98/45436, A1 (Genetics Institute, Inc.) 15. 10月. 1998 (15. 1 0. 98) 配列番号67等 & AU, 9868910, A & EP, 973896, A2	<u>8, 9</u> 1-7, 10-21
A	J. Clin. Invest. Vol. 102 No. 4 (1998) Miyata T. et al. "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, Is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy" p. 828-836	1-21

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 03. 00

国際調査報告の発送日

11.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4 B

9 5 4 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3448